УДК 576.893.577

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ СЕМЕЙСТВА HSP70 МИКРОСПОРИДИИ PARANOSEMA LOCUSTAE CANNING В ЗАРАЖЕННОМ ЖИРОВОМ ТЕЛЕ САРАНЧИ

© И. В. Сендерский, О. А. Павлова, С. А. Тимофеев, В. В. Долгих

Всероссийский НИИ Защиты растений РАСХН
ш. Подбельского, 3, С.-Петербург, Пушкин, 196608
E-mail: senderskiy@mail.ru

Поступила 05.12.2013

Предложен метод иммуномечения белков микроспоридии *Paranosema locustae* на криосрезах зараженного жирового тела перелетной саранчи. В отличие от иммуномечения отдельных клеток паразита и искусственно зараженных культур клеток хозяина, этот метод позволяет изучать молекулярные механизмы паразито-хозяинных отношений и, в частности, секреторные белки микроспоридий не только на клеточном, но и на тканевом уровне. Иммунолокализация ЭПР-специфичной и цитоплазматической форм молекулярных шаперонов семейства Hsp70 на криосрезах показала накопление этих белков в соответствующих компартментах внутриклеточных стадий развития *P. locustae* и их отсутствие в структурах хозяина. Это позволяет использовать их для диагностики очагов микроспоридиоза в зараженных тканях, а также для колокализации с секреторными белками *P. locustae* в качестве маркера клетки паразита. Во время спорогонии в зараженной клетке хозяина цитоплазматическая форма шаперона частично уходит из поврежденных спорами стадий внутриклеточного развития. В связи с этим изучение молекулярных механизмов паразито-хозяинных взаимоотношений целесообразно проводить на более ранних этапах инфекции до этапа активной спорогонии.

Ключевые слова: микроспоридии, жизненный цикл, Hsp70, антитела.

Микроспоридии — группа одноклеточных эукарнот, внутриклеточных паразитов животных. В жизненном цикле микроспоридий происходит чередование стадий внутриклеточного развития и расселительной стадии — споры (Исси, 1986). Исследования в области молекулярной биологии микроспоридий выявили принципиальное отличие физиологии этих паразитов на разных этапах жизненного цикла (Долгих и др., 2011). Так, оказалось, что спора не является покоящейся стадией в классическом понимании, в ней показано накопление и активность ферментов гликолиза и редуцированной электрон-транспортной цепи (Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al., 2011), тогда как стадии внутриклеточного развития (меронты и споронты) предельно упростили свой метаболический аппарат, прямо эксплуатируя энергетические ресурсы клетки хозяина с помощью специализированных АТФ/АДФ переносчиков пластидно-бактериального типа (Tsaousis et al., 2008). Одновременно стадии внутриклеточного развития используют целый набор секреторных белков (секретом), возможно принимающий участие в регуляции паразито-хозяинной системы (Долгих и др., 2010; Cuomo et al., 2012). Наличие подобных механизмов регуляции описано для внутриклеточных паразитов из групп Apicomplexa и Kinetoplastida (Nandan et al., 2002; Carmen, Sinai, 2007; Gilbert et al., 2007; Ravindran, Boothroyd, 2008; Schmuckli-Maurer et al., 2009).

Исследование и диагностика микроспоридиозов сильно затруднены проблемой визуализации паразитов на ранней стадии инфекции. В то время как спора, имеющая толстую светопреломляющую оболочку и характерную форму, относительно легко визуализируется с помощью световой микроскопии, доспоровые стадии требуют применения специальных методов окраски. Перспективным подходом может стать метод иммунолокализации с помощью специфичных антител к белкам внутриклеточных стадий жизненного цикла микроспоридий. В целом такие антитела можно будет использовать для иммунодиагностики микроспоридиозов, а антитела к внутренним белкам как маркеры того или иного компартмента клетки паразита и как контроль целостности этих компартментов при работе с зараженными тканями хозяина.

В качестве таких внутренних белков для изучения молекулярных механизмов взаимодействия внутри паразито-хозяинной системы *P. locustae*—*Locusta migratoria* L. мы предложили использовать молекулярные шапероны семейства Hsp70 этого паразита. Эти белки имеют высокий уровень экспрессии на всех стадиях жизненного цикла, являются растворимыми, а их отдельные формы, по нашим предварительным данным, специфично накапливаются в различных компартментах эукариотической клетки, в том числе клетки микроспоридий (цитоплазма, митохондрии и цистерны эндоплазматического ретикулюма (ЭПР)) (Долгих и др., 2012).

Анализ генома *P. locustae* позволил выявить 4 гена, кодирующие белки семейства Hsp70, гомологичные генам других видов микроспоридий *Nosema ceranae* и *Encephalitozoon cuniculi*. Внутриклеточная локализация этих шаперонов предварительно была предсказана на основе компьютерного анализа аминокислотных последовательностей. Митохондриальная форма Hsp70 (в случае микроспоридий правильнее говорить о митосомальной форме, поскольку у этих паразитов сохранились лишь рудиментарные митохондрии — митосомы) несет соответствующую сигнальную аминокислотную последовательность и локализуется в матриксе митосом (Williams et al., 2002; Tsaousis et al., 2008; Dolgikh et al., 2011). Для ЭПР-специфичной формы Hsp70 показано наличие N-концевого сигнального пептида, ответственного за транспорт и транслокацию белка внутрь ЭПР. Этот же сигнальный пептид необходим для следования белковых молекул по секреторному пути. Таким образом, наши представления о конечной локализации этой формы Hsp70 в цистернах ЭПР являются предварительными и требуют дополнительного исследования. Другие две формы этих шаперонов не имеют предсказанных сигнальных последовательностей, что может свидетельствовать об их цитоилазматической локализации. Отсутствие у всех четырех форм гидрофобных трансмембранных доменов подтверждает, что представители семейства Hsp70 являются растворимыми белками.

Указанные выше митосомальная, ЭПР-специфичная и одна из цитоплазматических форм Hsp70 были использованы в качестве маркеров для контроля за целостностью соответствующих клеточных компартментов паразита при работе с зараженным жировым телом саранчи (Долгих и др., 2012). Было показано, что первые две формы при мягкой гомогенизации и центрифугировании жирового тела полностью остаются в осадках, что говорит об их тесной связи с соответствующими мембранными компартментами. В то же время при обработке тканей ультразвуком или замораживанием—оттаиванием некоторое количество этих белков попадает в супернатант, что соответствует частичному разрушению митосом и цистерн ЭПР и высвобождению оттуда этих белков. Цитоплазматическая форма Hsp70 попадает в значительных количествах в растворимую фракцию даже при мягкой гомогенизации и последующем центрифугировании. По нашим предварительным данным, этот белок высвобождается в физиологический раствор уже на стадии препарирования лопастей зараженного жирового тела даже без их гомогенизации. Возможно, это связано с нарушением плазматической мембраны некоторой части меронтов и споронтов паразита при препаровке и гомогенизации тканей хозяина и может служить маркером целостности этих клеток. С другой стороны, это явление может быть объяснено естественным разрушением цитоплазматического компартмента меронтов и споронтов в процессе спорогонии с последующим высвобождением его содержимого в цитоплазму гипертрофированной клетки жирового тела хозяина.

Для иммунолокализации молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *P. locustae* нами предложен метод изготовления криосрезов зараженного жирового тела перелетной саранчи. Это позволит изучать молекулярные основы микроспоридиоза одновременно на клеточном и тканевом уровнях, что невозможно в случае классического иммунофлюоресцентного анализа внутриклеточных паразитов в культурах клеток насекомых и млекопитающих (Xu et al., 2006; Goldberg et al., 2008; Williams et al., 2008). В настоящем исследовании мы проводили иммуномечение цитоилазматической и ЭПР-специфичной формы рассматриваемых шаперонов, так как митосомальная форма уже в достаточной степени изучена (Dolgikh et al., 2011). Информация о локализации этих форм Hsp70 в компартментах клетки паразита или за ее пределами поможет проверить и дополнить полученные ранее данные, а также окажется незаменимой при исследовании секретома микроспоридий методом колокализации с этими белками. На тканевом уровне иммуномечение клеток паразита станет удобным инструментом изучения патогенеза микроспоридиоза и, в частности, позволит дать объяснение явлению устойчивого загрязнения проб жирового тела хозяина цитоплазматическим белком паразита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клонирование генов, гетерологичная экспрессия и очистка рекомбинантных ЭПР-специфичной и цитоплазматической форм Hsp70 *P. locustae*, а также получение и очистка антител к ним были подробно описаны ранее (Долгих и др., 2012).

Материал для иммуномечения готовили следующим способом: зараженное *P. locustae* жировое тело перелетной саранчи препарировали и фиксировали 4%-ным параформальдегидом на PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.76 mM KH_2PO_4, pH 7.4). Затем образцы ткани инкубировали в 50 мМ глицине на PBS, осуществляли криопротекцию в 30%-ной сахарозе и замораживали в жидком азоте. Криосрезы толщиной 10 мкм изготовляли на криотоме Microm HM 520 и помещали на предметные стекла.

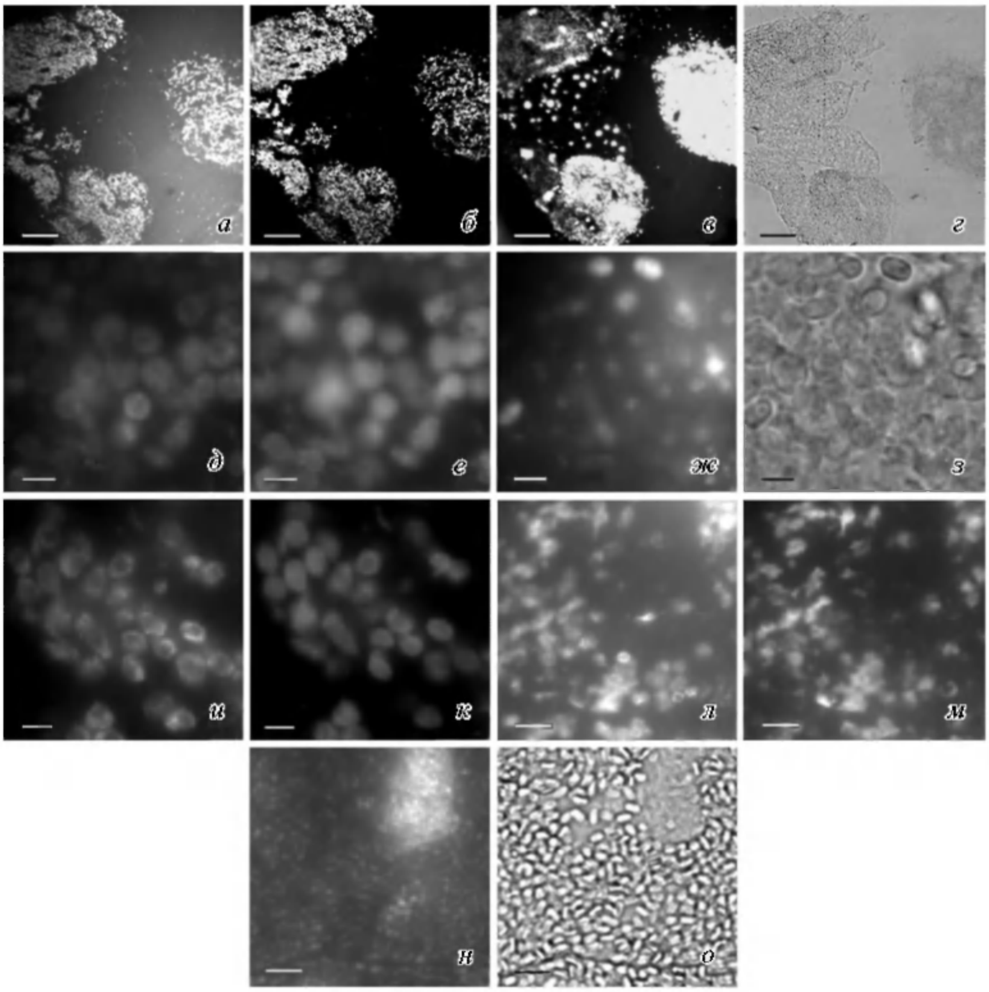
В дальнейшем криосрезы блокировали в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина на ТТБС (1.5M NaCl, 0.5M Трис-HCl pH 8.0, 0.05 % Tween80), инкубировали с первыми антителами ночь при температуре 4 °C, отмывали ТТБС и инкубировали с антивидовыми флюоресцентными конъюгатами AF 488 и AF 546 (Life Technologies). Первые и вторые антитела использовали в разведении 1:50. Для визуализации ядер срезы дополнительно окрашивали ДАФИ (4’, 6-диамидино-2-фенилиндол). Готовые препараты просматривали на флюоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axiolmager M1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела антителами к цитоилазматической и ЭПР-сиецифичной формам Hsp70 позволило визуализировать стадии внутриклеточного развития микроспоридий (меронты и споронты), но не споры и споробласты, так как последние, по-видимому, обладают непроницаемой для иммуноглобулинов оболочкой. Окрашивание имеет специфичный характер: флюоресценция наблюдается только в клетках паразита и не затрагивает тканевых и клеточных структур хозяина.

На первых этапах развития микроспоридиоза зараженные клетки встречаются группами по всему органу, формируя разрозненные очаги с паразитами, находящимися на разных стадиях жизненного цикла (см. рисунок, *а*—*г*). В дальнейшем отдельные очаги сливаются, незараженные клетки жирового тела исчезают, и инфекция становится генерализованной.

На срезах жирового тела внутриклеточные стадии жизненного цикла *P. locustae* встречаются только внутри клеток саранчи, в их цитоплазме, обычно целиком ее заполняя. Остается свободной от микроспоридий только область ядра. Количество клеток паразита варьирует в широких пределах и зависит, по всей видимости, только от размера зараженной клетки хозяина. На завершающем этапе спорогонии между зрелыми и созревающими спорами, непроницаемыми для иммуноглобулинов, встречаются одиночные неправильной формы клетки *P. locustae*, имеющие специфическую флюоресцентную окраску (см. рисунок, *л*—*о*). Возможно, это остат-



Иммунолокализация молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *P. locustae* на криосрезах зараженного жирового тела перелетной саранчи.

а—г — отдельные очаги микроспоридиоза хорошо визуализируются антителами к Hsp70, в центре незараженные лопасти жирового тела; *д—к* — стадии внутриклеточного развития имеют характерные картины окрашивания антителами к двум формам молекулярных шаперонов; *л—о* — остатки стадий внутриклеточного развития на позднем спорогональном этапе инфекции. Цитоплазма стадий окрашивается антителами к цитоплазматической форме Hsp70 неравномерно, границы клеток неровные. *а, д, и, л* — ЭПР — специфичная форма Hsp70; *б, е, к, м* — цитоплазматическая форма Hsp70; *в, ж, н* — окрашивание ДАФИ (ядра клеток хозяина и диплокарионы паразитов); *г, з, о* — светлое поле. Масштабные линейки: *а—г* — 100 мкм, *д—к* — 4 мкм, *л—о* — 10 мкм.

Immunolocalization of microsporidium *P. locustae* Hsp70 family chaperones on cryosections of locust infected fat body.

а—г — separate microsporidiosis lesions visualized by antibodies to Hsp70; in the middle: uninfected lobes of fat body; *д—к* — intracellular stages of development have characteristic staining patterns with antibodies to two forms of molecular chaperones; *л—о* — remnants of stages of intracellular development at late sporogonal stage of infection. Cytoplasm of cells is unevenly stained with antibodies to cytoplasmic form of Hsp70; cell borders are jagged. *а, д, и, л* — EPR — specific form of Hsp70; *б, е, к, м* — cytoplasmic form of Hsp70; *в, ж, н* — DAPI staining (host cells nuclei and diplocarions of parasites); *г, з, о* — bright field microscopy. Scale bar: *а—г* — 100 µm, *д—к* — 4 µm., *л—о* — 10 µm.

ки более ранних стадий жизненного цикла, задержавшихся в своем развитии и в значительной степени поврежденных формирующимися вокруг них спорами.

Обе формы Hsp70 одновременно присутствуют в значительных количествах во всех внутриклеточных стадиях жизненного цикла (см. рисунок, *д—к*). Однако распределение этих белков в клетке паразита различно. Иммуномечение антителами к ЭПР-специфичной форме создает дискретную картину окрашивания, выявляя обширную сетеподобную структуру в цитоплазме паразита. Скорее всего, эта структура действительно соответствует ЭПР клетки паразита, а возможно и аппарату Гольджи, вместе с которым представляет единый комплекс у микроспоридий (Beznoussenko et al., 2007). Локализация ЭПР-специфичной формы в таком внутреннем мембранном компартменте согласуется с полученными ранее данными о накоплении этого белка во фракции внутренних мембран гомогената зараженного тела (Долгих и др., 2012). Отсутствие рассматриваемого шаперона вне клеток паразита на криосрезах и в растворимой фракции гомогената жирового тела свидетельствует о несекретируемой природе последнего. Скорее всего, его основной функцией является транслокация и укладка (фолдинг) белковых молекул, поступающих в очень специализированную внутриклеточную транспортную систему микроспоридий.

Антитела к цитоплазматической форме шаперона в большинстве случаев равномерно окрашивают все внутриклеточное пространство клетки паразита, за исключением области диплокариона, что, по всей видимости, соответствует цитоплазматической локализации этого белка. Такое иммуномечение хорошо подчеркивает округлую, лишенную каких-либо выростов форму клеток внутриклеточных стадий развития *P. locustae*. В то же время в участках жирового тела, заполненных спорами микроспоридий, наблюдается немного иная картина (см. рисунок, *л—о*). Одиночные стадии внутриклеточного развития, располагающиеся в пространствах между спорами, имеют неравномерную окраску цитоплазмы, не позволяющую четко определить форму и границы клетки. Возможно, происходит механическое повреждение внутриклеточных стадий созревающими спорами, имеющими толстую ригидную оболочку, сопровождаемое нарушением целостности клеточной мембраны и потерей части белка — цитоплазматической формы Hsp70. Этим, вероятно, и объясняется явление контаминации этим белком растворимой фракции при разделении клеток паразита и хозяина (Долгих и др., 2012).

Полученные с помощью иммуномечения криосрезов результаты в целом хорошо вписываются в современные представления о патогенезе микроспоридиоза и молекулярной биологии этих паразитов, что свидетельствует об адекватности применения данного метода. Существенным отличием такого подхода от распространенного иммуномечения отдельных клеток паразита или искусственно зараженных клеточных культур является возможность изучения взаимоотношений паразит—хозяин и на тканевом уровне. Например, явление частичного разрушения внутриклеточных стадий жизненного цикла *P. locustae* и попадание внутренних белков паразита в цитоплазму клетки хозяина при поздней спорогонии делает невозможным изучение молекулярных механизмов регуляции паразито-хозяинной системы в целом и секретома микроспоридий в частности на этом этапе развития инфекции. Такие исследования имеет смысл проводить только на более ранних этапах патогенеза микроспоридиоза. Отсутствие обеих форм молекулярных шаперонов на срезах зараженного жирового тела саранчи вне клетки паразита и специфическое накопление этих белков в его клеточных компартментах позволяют использовать их для колокализации с белками, имеющими секреторную природу и предположительно участвующими в паразито-хозяинной регуляции в качестве контроля.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 12-04-01517-а).

Список литературы

Долгих В. В., Павлова О. А., Сендерский И. В., Пэн Г. 2010. Секреторные белки микроспоридии *Paranosema locustae* и их участие в патогенном воздействии на организм перелетной саранчи *Locusta migratoria*. Вестн. защиты растений. 1: 48—51.

Долгих В. В., Сендерский И. В., Павлова О. А., Наумов А. М. 2011. Уникальные особенности энергетического обмена микроспоридий как результат длительной адаптации к внутриклеточному развитию. Паразитология. 45 (2): 147—157.

Долгих В. В., Сендерский И. В., Павлова О. А., Тимофеев С. А., Наумов А. М. 2012. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства Hsp70 микроспоридий в изучении секретома внутриклеточных паразитов. Паразитология. 46 (6): 479—492.

Исси И. В. 1986. Микроспоридии как тип паразитических простейших. Протозоология. 10: 6—137.

Beznoussenko G. V., Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Semenov P. B., Tokarev Y. S., Trucco A., Micaroni M., Giandomenico D. Di, Auinger P., Senderskiy I. V., Skarlato S. O., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Y. Y., Pavelka M., De Matteis M. A., Luini A., Sokolova Y. Y., Mironov A. A. 2007. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and avesicular mechanisms of function. Journal of Cell Science. 120: 1288—1298.

Carmen J. C., Sinai A. P. 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. Molecular Microbiology. 64: 904—916.

Cuomo C. A., Desjardins C. A., Bakowski M. A., Goldberg J., Ma A. T., Becnel J. J., Didier E. S., Fan L., Heiman D. I., Levin J. Z., Young S., Zeng Q., Troemel E. R. 2012. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. Genome Research. 22 (12): 2478—2488.

Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Beznoussenko G. V. 2009. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonospora) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells. FEMS Microbiology Letters. 293: 285—291.

Dolgikh V. V., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Naumov A. M., Beznoussenko G. V. 2011. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora (Paranosema) locustae* spores: mitosomes retain their role in microsporidial energy metabolism. Eukaryotic Cell. 10: 588—593.

Gilbert L. A., Ravindran S., Turetzky J. M., Boothroyd J. C., Bradley P. J. 2007. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. Eukaryotic Cell. 6: 73—83.

Goldberg A. V., Molik S., Tsaousis A. D., Neumann K., Kuhnke G., Delbac F., Vivares C. P., Hirt R. P., Lill R., Embley T. M. 2008. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. Nature. 452: 624—629.

Nandan D., Yi T., Lopez M., Lai C., Reiner N. E. 2002. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. Journal of Biological Chemistry. 277: 50 190—50 197.

Ravindran S., Boothroyd J. C. 2008. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. Traffic. 9: 647—656.

Schmuckli-Maurer J., Casanova C., Schmied S., Affentranger S., Parvanova I., Kang'a S., Nene V., Katzer F., McKeever D., Muller J., Bishop R., Pain A., Dobbelaere D. A. E. 2009. Expression Analysis of the *Theileria parva* Subtelomere-Encoded Variable Secreted Protein Gene Family. PLoS One. 4: e4839.

Tsaousis A. D., Kunji E. R., Goldberg A. V., Lucocq J. M., Hirt R. P., Embley T. M. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. Nature. 453: 553—556.

Williams B. A., Cali A., Takvorian P. M., Keeling P. J. 2008. Distinct localization patterns of two putative mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. J. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 55: 131—133.

Williams B. A., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. Nature. 418: 865—869.

Xu Y., Takvorian P., Cali A., Wang F., Zhang H., Orr G., Weiss L. M. 2006. Identification of a New Spore Wall Protein from *Encephalitozoon cuniculi*. Infection and Immunity. 74 (1) 239—247.

IMMUNOLOCALIZATION OF MICROSPORIDIUM PARANOSEMA LOCUSTAE CANNING HSP70 FAMILY PROTEINS IN LOCUST INFECTED FAT BODY

© I. V. Sendersky, O. A. Pavlova, S. A. Timofeev, V. V. Dolgikh

Key words: microsporidia, life cycle, Hsp70, antibodies.

SUMMARY

Immunolabeling method of microsporidium *Paranosema locustae* proteins on cryosections of locust infected fat body was proposed. In contrast to single parasite cells and artificially infected host cell cultures, this method allows to study molecular mechanisms of host-parasite relationships and in particular the secretory microsporidial proteins either at cellular or tissue level. Immunolocalization of the EPR-specific and cytoplasmic forms of Hsp70 family of molecular chaperones on cryosections showed accumulation of these proteins in the respective compartments of intracellular developmental stages of *P. locustae* and their absence in host structures. This allows to use them in diagnostics of microsporidiosis lesions in infected tissues as well as in colocalization analysis with *P. locustae* secretory proteins as a marker of parasite. The cytoplasmic chaperone stains cytoplasmic compartment homogeneously, but in the infected host cell during sporogony it disappears partially from the intracellular stages of development which damaged by maturing spores. Thereby study of molecular mechanisms of host-parasite relationships is to be carried out at the earlier stages of infection before active sporogony.